

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25840086

研究課題名(和文)細胞系譜の特定と遺伝子機能の解析に基づいた、イモリ心筋再生様式の解明

研究課題名(英文) Study of the mode of newt myocardial regeneration based on identification of the cell lineage and functional analysis of the cell cycle related genes.

研究代表者

林 利憲 (Hayashi, Toshinori)

鳥取大学・医学部・准教授

研究者番号：60580925

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：再生研究のモデル動物であるイモリを用いて、遺伝的ラベルによる細胞系譜追跡実験系を初めて確立した。そしてイモリ的心臓再生過程では、既存の心筋細胞が増殖することを明らかにした。次に、イモリではTALENを用いた遺伝子ノックアウトが効率よく起こること、熱誘導型のプロモーターと赤外線レーザーを用いた局所的な遺伝子発現誘導系が機能することを報告した。さらに、より詳細な遺伝子の機能解析を可能とするために、コンディショナルノックアウトイモリの作製に向けたゲノム編集技術の技術的な基盤を整備した。

研究成果の概要(英文)：Using Iberian ribbed newt that is useful a model animal for regeneration biology, we established a cell lineage tracing system by genetic labeling. We showed the pre-existing cardiomyocytes proliferated during cardiac regeneration in the newts. We reported that TALEN-mediated gene targeting and an infrared laser mediated local gene induction by IR-LEGO system in the *P. waltl*. Moreover, we prepared basic data for genome editing in the newts in order to establish conditional knock-out system that enable more detailed analysis in organ regeneration.

研究分野：再生生物学

キーワード：イベリアトゲイモリ 心臓再生 心筋細胞 細胞系譜 トランスジェニック ゲノム編集

1. 研究開始当初の背景

イモリは既知の脊椎動物のなかで最も強い再生能力を持ち、心臓をも再生することができる。しかしながら、再生した心筋組織に含まれる心筋細胞がどの細胞に由来するのか、心筋細胞の幹細胞は存在するのか？さらに再生にはどのような遺伝子の機能が必須であるのか、その過程はどこまで発生現象と共通であるのか？といった点は明らかでなかった。これらを解明する為には、トランスジェニック動物を用いた細胞のラベル・追跡実験や遺伝子破壊(ノックアウト)実験が強力な手段となるが、イモリではそのような実験系自体が確立されてはいなかった。この様な背景に対して研究代表者は、自ら構築したイペリアトゲイモリの遺伝子操作実験系を進展させることで、細胞系譜の追跡、再生に寄与する細胞の特定と、心筋再生を制御する遺伝子機構の解明を目的とする本研究を実施した。

2. 研究の目的

(1)イモリ的心筋再生に寄与する細胞の特定
過去の研究により、イモリ心臓の再生には残された心筋細胞の寄与が重要であると考えられてきた。しかし十分な証拠は得られていない。再生の機構を明らかにする上で、組織を再生する細胞の由来を知ることは重要な出発点である。そこで、トランスジェニック個体の作製が容易なイペリアトゲイモリを用いて、心筋組織を構成する細胞について、特異的プロモーターを利用して遺伝的ラベル・追跡実験を行うこととした。これにより、ラベルした細胞が、再生した組織のどの細胞種に分化するのか、再生部位に占める割合はどの程度かを示すことができる。これにより心筋組織の再生のパターンを明らかにすることを旨とした。

(2)イモリ心筋組織の再生を制御する遺伝子の同定と、その機能の解明

心筋組織の再生過程を制御する機構を明らかにすることで、何故イモリでは再生が可能であるのかを示す。この為には、再生時期特異的なコンディショナルノックアウトや発現誘導を行い、その再生に於ける機能を解析する必要があるため、そのための実験系を確立した上で、心筋再生を制御する遺伝子とその機能を明らかにすることを目指す。解析の対象は、心臓の発生に必須と考えられている遺伝子の他、研究代表者らの行ったイペリアトゲイモリの正常及び再生中心臓のトランスクリプトーム解析から得た候補遺伝子である。

3. 研究の方法

(1)再生過程における細胞系譜追跡のためのラベル法の確立

心筋細胞において特異的に発現する遺伝子のプロモーターと薬剤誘導型 Cre リコンビナ

ーゼを利用して、心筋細胞を遺伝的にラベルできるトランスジェニックイモリを作製した。このイモリ的心筋細胞では、投与した薬剤(タモキシフェン)依存的に Cre リコンビナーゼが loxP では含まれた Stop コドンを除去する。これにより GFP の発現が開始して心筋細胞がラベルされる。この方法ならばタモキシフェン処理時に心筋細胞であったものだけがラベルされ、その細胞が他の細胞に分化形質を転換しても、ラベルは維持される。よって、その細胞の系譜を追跡して、再生した組織に対する寄与を特定できる。さらにプロモーターを変えることで様々な細胞をラベル可能である。本研究では心筋型ミオシン遺伝子のプロモーターでドライブされるタモキシフェン誘導型 Cre のコンストラクト(Myosin heavy chain-MerCre)と、Cre による loxP 組換え依存的に GFP を発現できるコンストラクト(Floxed-Stop GFP)をもつダブルトランスジェニックイモリを作製した上で、タモキシフェン処理の条件検討を行った。

(2)遺伝的ラベルを駆使した細胞系譜の追跡による、再生組織に対する寄与の特定

前項(1)において作製した Myosin heavy chain-MerCre と Floxed-Stop GFP をもつダブルトランスジェニックイモリを使用した。あらかじめ蛍光顕微鏡を用いた観察により、これらのイモリがタモキシフェン誘導前には GFP を発現していないことを確かめた。その上で、タモキシフェンの投与を行い、Cre-loxP 組換えを誘導して、心筋細胞を遺伝的に GFP でラベルした。次にこれらのイモリに手術を行い、心室の先端側約 1/2 を切除することで心臓再生を引き起こした。このイモリを一定期間飼育して、過程を追って試料を作成し、いずれの細胞が GFP を発現しているかを解析した。このとき増殖細胞をラベルする Edu を投与して、それらの細胞が増殖を経ているか否かを判定した。

(3)再生時期・細胞種特異的な遺伝子破壊(コンディショナルノックアウト)法と遺伝子発現誘導法の確立

コンディショナルノックアウト法の確立に向けた方法の検討

最初に、イモリで TALEN を使った遺伝子ノックアウトが可能か否かを検討するために、メラニン色素の合成に関わるチロシナーゼ遺伝子を破壊するための TALEN を使用した。この TALEN をコードする RNA を合成して、投与量を変えながらイモリの受精卵に投与した。それらの卵から発生した個体に対して、黒色素の有無の判定からノックアウトが起きていると予想された個体について遺伝子型を調べた。さらに、コンディショナルノックアウトの作製に向けて、TALEN によるノックアウトサイトに loxP をコードする DNA 断片を挿入できるか否かを検討した。

熱誘導型プロモーターによる局所的遺伝

子発現誘導系の確立

熱誘導型プロモーターの下流に目的の遺伝子をつないだ上で、赤外線レーザーを照射することで発現誘導する方法 (IR-LEGO 法) がイモリの心臓再生研究に有用であると考えた。この実験系を確立するために、熱誘導型プロモーターに GFP をつないだコンストラクトをもつトランスジェニックイモリに対して、レーザーの照射条件を検討した。

(4) コンディショナルノックアウトや遺伝子発現誘導を介した、心筋再生における遺伝子機能解析に向けた研究

ここまでの本研究の成果により、イモリの心臓では既存の心筋細胞が増殖することで再生が成立することが示された。そこで、細胞増殖に不可欠であることが、他の動物で広く知られている CDK1 遺伝子を、再生時の心筋細胞特異的に破壊するための研究を行った。CDK1 の機能を担う上で重要な第 2 エキソンの上流側と下流側を標的とする 2 組の TALEN を準備した。これらの TALEN をコードする RNA と loxP 配列をコードする DNA 断片を混合して、イモリ卵にマイクロインジェクションした。これらの卵から発生した個体の遺伝子型を調べて、loxP 配列の挿入の有無を調べた。

4. 研究成果

(1) 再生過程における細胞系譜追跡のためのラベル法の確立

本研究では Myosin heavy chain- MerCre と Floxed-Stop GFP のコンストラクトをもつダブルトランスジェニックイモリを効率的に作製することができた。さらにこれらのイモリ (F0 世代) に対して、適切なタモキシフェンの投与量と投与方法を決定することができ

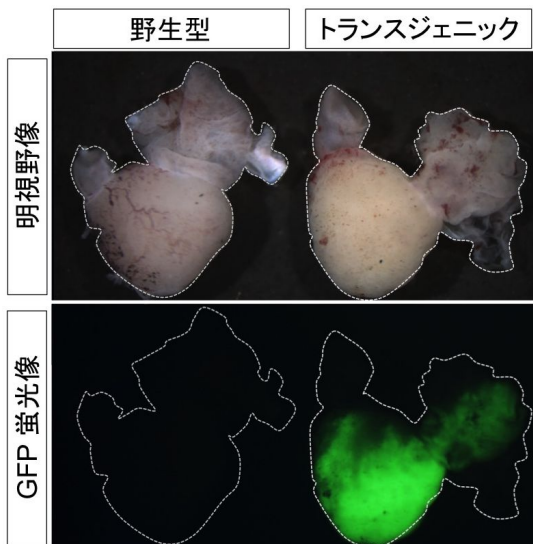


図1 Cre-loxP 組み換えにより GFP ラベルされたトランスジェニックイモリの心臓 (右) と野生型コントロール (左)

た。これにより、イモリの心筋細胞特異的に、かつタモキシフェン依存的に GFP の発現を誘導することに成功した (図 1)。作製したイモリは次の研究項目 (2) において使用した。現

在は残されたトランスジェニック個体を交配させて得た F1 および F2 世代のイモリ育成中であり、更なる研究への利用が期待される。今後、交配により作製されたダブルトランスジェニックを実験に用いるようになれば、細胞をより均一、安定的にラベルすることが可能になる。加えて、この組換え系は Cre を発現させるためのプロモーターを変更するだけで、心臓の再生以外にも利用可能なプラットフォームとなり得る。

(2) 遺伝的ラベルを駆使した細胞系譜の追跡による、再生組織に対する寄与の特定

前項 (1) において、心筋細胞を特異的にラベルできるトランスジェニックイモリを作製できたことから、既存の心筋細胞のラベルと追跡実験を推進することができた。タモキシフェン投与により GFP が誘導された心臓において、心室切除から 2 週間後には、GFP、心筋細胞マーカーおよび EdU の 3 重陽性細胞が多数認められた。この結果により、イモリでは既存の心筋細胞が増殖することで再生が起こることが明らかとなった。また、併せて行った心筋細胞の増殖パターンの詳細な解析から、イモリの心臓再生様式は、四肢の再生や魚類の心臓再生で報告されている付加的様式とは異なっていることが分かった。イモリの心臓は心室の残された領域が全体として形態を変えることで回復するという、補

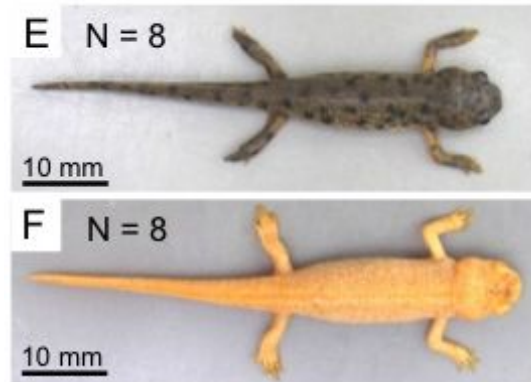


図2 TALENによりチロシナーゼをノックアウトされたイモリ (下) と野生型個体 (上)。

Dev. Growth Differ. (2014)より転載

的な様式で再生することを示した。

ここまでの研究で確立された、イモリの細胞種・時期特異的ラベル法と、それを用いた細胞系譜の追跡法は、心臓再生の研究にとどまらず他の器官や組織、さらには発生過程の研究にも幅広く利用できる重要な実験系となる。

(3) コンディショナルノックアウト法と遺伝子発現誘導法の確立

コンディショナルノックアウト法の確立に向けた方法の検討に関して

チロシナーゼをノックアウトするための TALEN を使用した実験では、RNA をマイクロ

インジェクションした個体のほぼ全てにおいて、チロシナーゼ遺伝子を完全にノックアウトしてアルビノ化できる条件を決めることに成功した(図2)。さらに、チロシナーゼのアリルに対して loxP 配列を挿入することもできた。これらの研究を通じて、イペリアトゲイモリではTALENが極めて効率よく作用するため、次のステップであるコンディショナルノックアウト作製の強力なツールとなることが分かった。これはイモリやアホロートルを含む有尾両生類で初めて、TALENによるゲノム編集が可能であることを示した成果であり、原著論文として報告した。

熱誘導型プロモーターによる局所的遺伝子発現誘導系(IR-LEGO法)の確立に関して熱誘導型プロモーターにGFPをつないだコンストラクトをもつトランスジェニックイモリに対して赤外線レーザーの照射を行ったところ、照射から16時間後にはGFP遺伝子の蛍光が確認された。これは、これまでに行われてきた、個体全体を高温に暴露して遺伝子を誘導する場合よりも、鋭敏な発現誘導が起こったことを意味している。よって、イモリにおいてもIR-LEGO法が有効であることが示された。この成果は、弘前大学の横山博士、基礎生物学研究所の亀井博士、理化学研究所の森下博士らにより行われた、同じ両生類のモデル動物であるアフリカツメガエルの成果と合わせて原著論文として報告した。続いてイモリの再生組織に対する照射を行い、再生研究にも有用であることを示した。

(4)コンディショナルノックアウトや遺伝子発現誘導を介した、心筋再生における遺伝子機能解析に向けた研究

本研究で用いたCDK1遺伝子の第2エキソン上流側と下流側を標的とする2組のTALENは、チロシナーゼを標的とするTALENと同様、100%近い効率でそれぞれが標的としたイモリのCDK1遺伝子のゲノム配列を切断することが分かった。このことから、イモリの遺伝子ノックアウト法として、TALENが高い有用性をもつことが確認された。しかしながら、当初計画したloxP配列をコードする短い2本鎖DNAとTALENをコードするRNAを直接混合してインジェクションする方法では、CDK1のアリルには挿入が起こらないことが分かった。そこで広島大学のグループによって開発されたTAL-Pitch vector法を応用した挿入方法に切り替えて実験を続けた結果、目的の領域に対して、loxP配列が挿入されたことを示唆する結果が得られたことから、この方法が有効であると言える。現在はCDK1コンディショナルノックアウトイモリの完成を目指してさらに研究を進めている。本研究により得られたTALENによるイモリの遺伝子ノックアウト法の研究成果や、ノックアウト部位に対する任意の遺伝子配列の挿入に関する情報は、イモリにおけるゲノム編集法の確立に向けた基盤となる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

林利憲、竹内隆、再生生物学の新時代へ～古くて新しいモデル生物イペリアトゲイモリ、実験医学、査読無、34巻、2016、pp.1473-1476+

Kawasumi, A., Hayashi, T., Kobayashi, T., Nagayama, C., Hayashi, S., Kamei, Y., Morishita, Y., Takeuchi, T., Tamura, K., Yokoyama, H. Application of local gene induction by infrared laser-mediated microscope and temperature stimulator to amphibian regeneration study. Dev. Growth Differ. 査読有、Vol.57、2015、pp.601-613.

Hayashi, T., Sakamoto, K., Sakuma, T., Yokotani, N., Inoue, T., Kawaguchi, E., Agata, K., Yamamoto, T., and Takeuchi, T. Transcription activator-like effector nucleases efficiently disrupt the target gene in Iberian ribbed newts (*Pleurodeles waltl*), an experimental model animal for regeneration. Dev. Growth Differ. 査読有、Vol.56、2014、pp.115-121.

竹内隆、田根将志、林利憲、心臓の発生と再生における心筋細胞の増殖制御機構、実験医学、査読無、33巻、2014、pp.1170-1175

竹内隆、林利憲、種間における自律的な心臓再生能力の違いは何によって決まるのか?、実験医学、査読無、32巻、2014、pp.29-35

〔学会発表〕(計12件)

林利憲、土屋 絵莉、茗荷 あゆみ、竹内隆 イモリ的心臓再生は既存の心筋細胞による補償的再生によって成立する 日本分子生物学会 口頭発表 2015年12月3、4日 神戸ポートピアホテル 神戸市

林利憲、竹内隆 イペリアトゲイモリを用いた再生研究の展開 日本動物学会シンポジウム 招待講演 2015年9月18日 朱鷺メッセ 新潟市

林利憲、竹内隆 イモリ研究をプラットフォーム化するにはあと何が必要か? 次世代両生類研究会 招待講演 2015年8月24日 基礎生物学研究所 岡崎市

林利憲、竹内隆 イモリの「ユニークさ」をどのように活かすのか? ユニーク動物研究会 招待講演 2015年8月18日 基礎生物学研究所 岡崎市

林利憲、茗荷 あゆみ、佐久間 哲史、亀井 保博、横山 仁、山本 卓、竹内隆 有用

なモデル動物となり得る、イペリアトゲイモリを用いた遺伝子操作法の確立 日本分子生物学会 2014年11月27日 パシフィコ横浜 横浜市

Hayashi, T., Sakuma, T., Myouga, A., Sakamoto, K., Yokotani, N., Inoue, T., Kawaguchi, E., Agata, K., Yamamoto, T., and **Takeuchi, T.** Genome editing is a powerful tool for studies in newt cardiac regeneration. 日本遺伝学会大会 ワークショップ 招待講演 2014年9月17日 長浜バイオ大学 長浜市

Hayashi, T., Myouga, A., Yokotani, N., Takeuchi, T. Development of molecular genetic system for newts and lineage tracing analyses in cardiac regeneration. EMBO Conference The molecular & Cellular Basis of Regeneration & Tissue Repair, Sep. 6-10, 2014, Sant Feliu de Guixols, Spain.

Hayashi, T., Sakamoto, K., Sakuma, T., Myouga, A., Yokotani, N., Inoue, T., Kawaguchi, E., Agata, K., Yamamoto, T., Takeuchi, T. TALEN-mediated genome editing is very useful in Iberian ribbed newts (*Pleurodeles waltl*), an experimental model animal for regeneration. 日本発生生物学会 ワークショップ 招待講演 2014年5月27-28日 ウィンク愛知 名古屋市

Hayashi, T., Yokotani, N., Matsumoto, A., Myouga, A., Sakamoto, K., Inoue, T., Kawaguchi, E., Agata, K., Sakuma, T., Yamamoto, T., Takeuchi, T. Molecular genetic system for regenerative studies using newts Iberian Ribbed Newts (*Pleurodeles waltl*). CDB Symposium 2014, 2014年3月10-12日 RIKEN CDB 神戸市

林 利憲、茗荷 あゆみ、横谷 直樹、竹内 隆 イモリの心臓再生における心筋細胞の増殖と、再生心筋組織に対する寄与 日本再生医療学会 2014年3月4-6日 国立京都国際会館 京都市

林 利憲、茗荷 あゆみ、横谷 直樹、佐久間 哲史、山本 卓、竹内 隆 遺伝子操作、ゲノム編集技術を用いたイモリ再生研究の展開 日本動物学会 招待講演 2013年9月26-28日 岡山大学 岡山市

Hayashi, T., Yokotani, N., Matsumoto, A., Myouga, A., Okamoto, M., Takeuchi, T. Molecular genetic system for regenerative studies using newt. 日本発生生物学会、2013年5月28-31日 くにびきメッセ 松江市

〔図書〕(計3件)

Hayashi, T., and Takeuchi, T. (2015) Mutagenesis in Newts: Protocol for Iberian Ribbed Newts. In TALENs: Methods and Protocols. (eds. Kuhn, R., Wefers, B., and Wurst, W.), pp119-126 (担当ページ), Springer New York.

Hayashi, T. and Takeuchi, T. (2015) Gene Manipulation for Regenerative Studies Using the Iberian Ribbed Newt, *Pleurodeles waltl*. In Salamanders in Regeneration Research. (eds. A. Kumar and A. Simon), pp297-305 (担当ページ), Springer New York.

林 利憲、坂根 祐人、竹内 隆、鈴木 賢一 (2014) 両生類における TALEN を用いた遺伝子改変 実験医学別冊 羊土社、担当ページ pp.180-188

〔その他〕

鳥取大学医学部生命科学科生体情報学分野 ホームページ
[<http://www.med.tottori-u.ac.jp/biosign/5982.html>]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 利憲 (Hayashi Toshinori)

鳥取大学・医学部・准教授

研究者番号：605809251